

Erteilt auf Grund des Ersten Überleitungsgesetzes vom 8. Juli 1949
(WiGBl. S. 175)

BUNDESREPUBLIK DEUTSCHLAND



AUSGEGEBEN AM
19. MAI 1952

DEUTSCHES PATENTAMT

PATENTSCHRIFT

Nr. 839 245

KLASSE 30h GRUPPE 6

p 30882 II a / 30h D

Dr. med. Ewald Kanz, München
ist als Erfinder genannt worden

Dr. med. Ewald Kanz, München

Verfahren und Einrichtung zur Züchtung von Kleinlebewesen

Patentiert im Gebiet der Bundesrepublik Deutschland vom 15. April 1949 an
Patentanmeldung bekanntgemacht am 28. Juni 1951
Patenterteilung bekanntgemacht am 10. April 1952

Bei der bisher gebräuchlichen bakteriologischen Technik werden die Bakterien auf erstarrte Nährböden, z. B. Agar-Agar oder Gelatine, gebracht. Diese Kleinlebewesen bleiben an der Geloberfläche haften. Sie vermehren sich im Brutschrank und bilden Isolierte Kolonien.

Es ist bereits bekannt, als Agarersatznährböden saugfähige glasklare Folien in Verbindung mit Filterpapier zu verwenden, wobei diese Folien als auch das Filterpapier mit Nährlösung getränkt sind. Sowohl die festen gelierenden Nährböden als auch die auf Filterpapier gelegten Folienplatten haben Nachteile. Im Nährboden sammeln sich nämlich in der nächsten Umgebung jeder Bakterienkolonie mit der Zeit immer mehr Bakterienstoffwechselprodukte an, die das Wachstum der Keime allmählich zum Stillstand bringen.

Die wachsende Bakterienkolonie verbraucht zunächst in ihrem näheren, dann in immer weiter werdenden Umkreis die im Nährboden vorhandenen Nährstoffe. Dem weiteren Wachstum der Kolonie sind auch auf diese Weise enge Grenzen gesetzt.

Die Erfindung bezieht sich auf ein Verfahren zur Züchtung von Kleinlebewesen auf einem über einem Nährboden anzuordnenden saugfähigen Träger, welches bezweckt, die schwerwiegenden Nachteile der bekannten Verfahren restlos zu beseitigen und die Kleinlebewesen nicht nur in Reinkultur zu züchten, sondern sie während ihres Wachstums auf die verschiedenartigste Weise zu beeinflussen und dadurch der Stoffwechselforschung neue Wege aufzuzeigen. Gleich wichtig ist der weitere Vorteil des Verfahrens, das Zuchtmaterial vor einer vorzeitigen Zerstörung durch Über-

wucherung mit anderen Kleinlebewesen od. dgl. zu sichern und dadurch eine einwandfreie Diagnose zu ermöglichen.

Das neue Verfahren besteht darin, den Träger der Kleinlebewesen, welcher aus einer glasklaren Folie oder aus jedem anderen geeigneten Material mit saugfähiger Eigenschaft bestehen kann, während des Wachstums der Objekte auf einer oder auf beiden Seiten Medien auszusetzen, welche, im Gegensatz zu den bisherigen Methoden, beweglich, also z. B. flüssig, gasförmig, staubartig sind. Weitere Merkmale des Verfahrens liegen darin, diese Medien von außen qualitativ und quantitativ zu regeln und auf den Träger zwangsläufig einwirken zu lassen, was wieder mannigfaltig, so durch Besspülen, Druck, Vakuum usw., erfolgen kann.

Die Einzelwirkungen und Vorteile, welche gegenüber den mit festen Nährböden arbeitenden Verfahren erreicht werden, sind vielseitiger Art.

Vor allem kann geeigneter Nährboden in unbegrenzter Menge dem Objektträger zugeführt werden, so daß es zu einer Anhäufung von Bakterienstoffwechselprodukten um die auf dem Träger heranwachsenden Kolonien nicht kommen kann. Sie verteilen sich vielmehr sofort in der Nährflüssigkeit und werden aus der Nähe der Kolonien entfernt. Eine Verarmung an Nährstoffen in der Umgebung der Bakterienkolonien kann nicht vorkommen, da die untere Seite des Trägers ständig von neuer Nährflüssigkeit bespült wird, auch wenn diese nicht ständig erneuert wird. Mit diesen an sich jeder Nährflüssigkeit eigenen Vorteilen erzielt das neue Verfahren noch den Fortschritt, daß auf dem Träger wie bei gelierenden Nährböden getrennte Bakterienkolonien heranwachsen und somit eine Isolierung jeder einzelnen Mikrobenart gewährleistet ist. Die auf dem Träger herangewachsenen Bakterienkolonien können im Gegensatz zu den bekannten Verfahren frei von jeder Nährbodenmischung abgeerntet werden.

Für alle zu ihrem Wachstum Sauerstoff benötigenden Mikroben werden ebenso wie für die in sauerstofffreier Umgebung wachsenden Bakterien die besten Wachstumsbedingungen geschaffen, insbesondere wird die rasche Züchtung von Tuberkelbazillen, die auf den bisher verwendeten festen Nährböden nur langsam wachsen, ermöglicht. Umgekehrt kann für manche Bakterien das Wachstum verlangsamt oder sogar zum Stillstand gebracht werden.

Eine genaue Erforschung des Bakterienstoffwechsels ist erst mit dem Verfahren nach der Erfindung gegeben. Denn die Bakterienkultur kann ihren Wachstumsplatz auf dem Träger unverändert beibehalten, während die Nährbedingungen zu jedem Zeitpunkt verändert werden können. So kann jederzeit eine pH-Änderung erfolgen. Es kann ein neuer oder anders gearteter Nährstoff, z. B. Zucker, der vorhandenen Nährflüssigkeit beigegeben werden oder sie ersetzen. Das Hinzufügen von Vitaminen oder sonstigen Wachstumsstoffen ist möglich, deren Gehalt bzw. Verbrauch in der Nährflüssig-

keit beliebig bestimmt werden kann, ohne daß dabei die heranwachsende Kolonie gestört werden muß. Eine Reihe von Bakterien, Viren, Protozoen und anderen Mikroorganismen sind nur in Symbiose mit anderen lebenden Mikrobenarten anzutreffen. Durch das neue Verfahren ist erstmals die getrennte Züchtung dieser Kleinlebewesen und die weitere Erforschung ihrer Biologie ermöglicht. Die beiden Mikrobenarten werden durch den Träger getrennt, durch den der symbiotische Stoffaustausch erfolgt, ohne daß die beiden symbiotisch lebenden Arten gemischt werden. Dies trifft für eine Reihe von Bakterien, wie für Spirochäten, fusiforme Stäbchen, Protozoen sowie auch von Viren, z. B. für das Masernvirus, das Maul- und Klauenseuchevirus u. a., zu. Es können nunmehr auch Viren, deren Züchtung nur in flüssigen, lebendes Zellmaterial enthaltenden Nährböden möglich war, auf dem festen Träger kultiviert werden. An Stelle der sonst verwendeten Nährflüssigkeit wird unter den Träger eine mit Zellgewebe versehene Flüssigkeit gegeben. Durch den Träger diffundieren die von den lebenden Zellen in der Kultur sezernierten Virusstoffe (Wachstumsstoffe).

Die Menge der den Träger bespülenden Nährflüssigkeit kann während der gesamten Dauer des Züchtungsvorganges auch konstant bleiben, was besonders für die Stoffwechselforschung von Mikroorganismen zur genauen Messung von in einer bestimmten Zeit verbrauchten Nähr- und Wuchsstoffen und von sezernierten oder sonstwie umgewandelten Stoffen zweckmäßig ist. Ebenso kann nach dem Verfahren die Nährflüssigkeit während der Dauer des Züchtungsvorganges erneuert werden. Dies erfolgt entweder durch ständiges Vorbeiströmen der Nährflüssigkeit an der Trägerunterseite oder auch durch das Auswechseln der Nährflüssigkeit in bestimmten Zeitabständen.

Im folgenden werden Einrichtungen zur Durchführung des Verfahrens nach der Erfindung beschrieben. Die Erfindung erstreckt sich auch auf diese Einrichtungen.

Die in Fig. 1 im Höhenschnitt dargestellte Einrichtung dient insbesondere zur Durchführung des Verfahrens, bei der die Menge der Nährflüssigkeit konstant bleibt. In ein aus Glas oder aus anderen chemisch indifferenten Stoffen bestehendes schalenförmiges Gefäß 1 wird die Nährflüssigkeit durch einen angeschmolzenen Rohrstutzen 2 eingefüllt. Das Gefäß 1 ruht auf einem Gummiring 3 des Metallgehäuseunterteiles 4, welches mit einem Metallgehäuseoberring 6 durch einen Schraub- oder Bajonettverschluß lösbar verbunden werden kann. Über das Glasgefäß 1 wird der als Membrane ausgebildete Träger 5 dadurch gespannt, daß das Gehäuseoberteil beim Festdrehen die Trägermembran 5 über eine profilierte Gummidichtung 7 in eine ringnutenförmige Aussparung 8 des Gehäuseunterteiles 1 preßt und dabei spannt. In dem Gehäuseoberring 6 ist eine Feuchtigkeit abgebende Einlage 9, z. B. ein Filzring, eingelegt, durch den

bei dosierter Befeuchtung, die durch die Öffnung 10 von außen erfolgen kann, der gewünschte Feuchtigkeitsgrad erreicht werden kann. Über den Gehäuseoberring 6 greift ein Glasdeckel 11.

5 Besonders geeignet ist diese Einrichtung für die Zucht von anaeroben Bakterien auf biologischem Wege. Dabei wird der Glasdeckel 11 mit dem Gehäuseoberring 6 mittels eines Celluloseesterklebestreifens luftdicht verbunden (nicht gezeichnet). Sodann wird die unter dem Träger 5 befindliche Nährflüssigkeit mit dem biologischen Sauerstoffverzehrer, z. B. dem *Bazillus prodigiosus*, beimpft. Dieses Verfahren hat den weiteren Vorteil, daß der *Bazillus prodigiosus* nebenbei auch als Wuchsstoffbildner wirkt und das Wachstum der anaeroben Bakterien fördert.

Bei Züchtungsverfahren, mit denen ein schnelles und ausgiebiges Wachstum erzielt werden soll, wird gemäß der Erfindung eine Einrichtung nach Fig. 2 im Längsschnitt dargestellt, verwendet, die das Durchströmen der Nährflüssigkeit gestattet. Zweckmäßig wird diese Einrichtung als Großanlage gebaut, so daß eine große Ausbeute an Bakterien sowie ihrer Toxine möglich ist. Die Arbeitsweise wird außerordentlich vereinfacht.

Die Einrichtung besteht aus einer langen Wanne 12, z. B. aus Glas, die an dem einen Ende eine mit einem Hahn absperrbare Zuflußleitung 13 und an ihrem anderen Ende ein ebenfalls abstellbares Abflußrohr 14 hat. Die mit Nährflüssigkeit gefüllte und von ihr durchströmte Wanne 12 ist durch den Träger 5 abgedeckt. Die Wanne ist in einem Brutraum 16, der z. B. durch ein Glasrohr 17 gebildet ist, angeordnet, zu dem eine Zu- und Abflußleitung 18, 19 für beliebig zu temperierendes Wasser führt, so daß die durch Verdunstung im Brutraum entstehende Feuchtigkeit geregelt und der gerade den züchtenden Bakterienkultur angepaßt werden kann. Ein in den Brutraum ragender Feuchtigkeitsmesser 29 ermöglicht eine genaue Registrierung der erhaltenen Werte. Zur Regulierung der Temperaturverhältnisse ist der Brutraum 16, 17 von einem ebenfalls rohrenförmigen Heizmantel 20 umgeben. Die Einrichtung ist am vorderen und hinteren Ende durch die Abschlußplatten 22 und 23 abgeschlossen, die durch Schieber 24 und 25 verschließbare Öffnungen 26 und 27 zum Herausnehmen der Wanne 12 haben. In den Mantelraum zwischen Heizmantel und Brutraumwandung wird durch die Öffnung 21 gewärmte Luft eingeblasen, die von den üblichen elektrischen, mit Ventilatoren versehenen Heizanlagen bezogen wird. Es ist auch eine andere Heizung, z. B. durch Warmwasser oder unmittelbar durch elektrische Heizvorrichtungen, denkbar. Auf diese Weise kann auch die Temperatur im Brutraum genau geregelt werden. Ein in ihn hineinragendes Thermometer 28 ermöglicht die Temperaturkontrolle.

Bei dieser Einrichtung kann der Brutraum entsprechend einem Klimastaten oder einer Klimakammer den verschiedensten klimatologischen Bedingungen, z. B. Ionisierung der Luft, Erzeugung elektrischer Felder, verschiedenen Bestrahlungs-

arten u. dgl., unterworfen werden. Erst durch diese neuartige Klimatisierung des Brutraumes wird die Erforschung von morphologischen, biologischen und anderen Einflüssen von Klima und Wetter auf diese Bakterien sowie die Beeinflussung des Wachstums der Mikroorganismen ermöglicht.

Die als Großanlage gebaute Einrichtung mit durchströmender Nährflüssigkeit kann z. B. für die Gewinnung von Diphtherietoxinen zum Zweck der Impfstoffherstellung Verwendung finden. Die offene Oberseite der Wanne ist mit einem Träger 5 bespannt, dessen Oberfläche mit Diphtheriebakterien beimpft ist. Die Wanne ist mit flüssigem Diphtherienährboden gefüllt. Durch die Zuflußleitung der Wanne fließt ständig tropfenweise neue Nährflüssigkeit zu, während am unteren Ende durch das Abflußrohr die mit Toxinen und Stoffwechselprodukten gesättigte, verbrauchte Nährflüssigkeit abtropft, die dann zur weiteren Verarbeitung Verwendung finden kann.

Für die Gewinnung von Tetanusektotoxin zum Zweck der Impfstoffherstellung sowie zur Züchtung anderer Anaerobier muß im Brutraum eine sauerstofffreie Atmosphäre geschaffen werden. Dies kann entweder durch Schaffung eines Vakuums mittels Abpumpen der Brutraumluft oder auf chemischem Wege dadurch erfolgen, daß in dem Brutraum an Stelle von Wasser eine alkalische Pyrogallollösung gegeben wird, die den Sauerstoff chemisch bindet.

Für die Bakterienzüchtung von Keimen, die für eine optimale Wachstumsbedingung eine dosierte Menge eines bestimmten Gases benötigen, kann dieses Gas ebenfalls in den Brutraum geleitet werden.

Die erfindungsgemäße Anlage mit durchströmender Nährflüssigkeit kann nicht nur zur Herstellung von Impfstoffen, sondern auch als Großanlage in bakteriologischen Untersuchungslaboratorien für die Verarbeitung und Diagnose eingesandter Untersuchungsproben verwendet werden. Die Anlage ist dabei ähnlich wie die zur Herstellung von Impfstoffen dienende. Lediglich an Stelle des die Wanne bedeckenden Trägers werden schmale, die Breite der Rinne bedeckende, hintereinander angeordnete Einzelträger verwendet, welche in Rähmchen mittels geeigneter Klemmmittel dicht eingespannt sind oder auf der Nährflüssigkeit schwimmen. Den großen Vorteil der nach Fig. 2 ausgebildeten Anlage besteht darin, daß diese ohne Ortsveränderung auf einfache Weise, z. B. mittels in die Kammer eingeleiteten Dampfes oder Heißluft, sterilisiert werden kann.

Weiterhin erstreckt sich die Erfindung mit einer Verbesserung auf das Gebiet der Einsendung von Untersuchungsmaterial durch den praktischen Arzt an die Untersuchungsanstalten. Bisher gelangten bei Typhus und ähnlichen Darmkrankheiten Stuhl und Urin in eigenen Glasgefäßen sowie bei Diphtherie die Rachenabstriche in Glasröhrchen zur Einsendung. Es bestand dabei die Gefahr des Zerbrechens dieser Transportgefäße. Besonders bei Ruhrstuhleinsendungen kam außerdem ein Über-

wuchern von Fäulnis- und anderen Mikroorganismen vor, die in den meisten Fällen eine Diagnose unmöglich machen.

Gemäß der Erfindung werden Stuhl- und Urinproben sowie der Rachenabstrich bereits vom praktischen Arzt auf entsprechende Träger gebracht, die dann in bruch sicheren Hüllen an die Untersuchungsanstalt eingeschickt werden. Dort wird der Träger nach dem erfindungsgemäßen Verfahren auf die Nährflüssigkeit aufgesetzt, so daß das bisher notwendige nachträgliche Übertragen der Untersuchungsproben im Laboratorium wegfällt. Die Bakterienkulturen werden sodann in der den Gegenstand der Erfindung bildenden Einrichtung gezüchtet.

Der dem jeweiligen Krankheitsverdacht entsprechende Träger, z. B. für Typhus Fuchsinulfiträger und andere, für Diphtherie Natriumtelluritträger und andere, werden in genormten Größen in steriler regenerierter Celluloseumhüllung in den Handel gebracht, so daß sie für den praktischen Arzt jederzeit verfügbar gelagert werden können. Die Träger sind so auf einen Rahmen gespannt und von vornherein so geformt, daß sie nach ihrem Eingang in der Untersuchungsanstalt unmittelbar z. B. auf die mit durchströmender Nährflüssigkeit angefüllte Wanne einer Großanlage nach Fig. 2 aufgeschoben werden können.

Die zum Versand auf trockenem oder feuchtem Wege geeigneten Einrichtungen können verschieden, jedoch im Sinn des Erfindungsgedankens ausgebildet sein.

So zeigt Fig. 3 eine mit Nährflüssigkeit teilweise gefüllte Glasröhre 30, in die eine zweite, unten offene, mit einem Träger 5 bespannte Röhre 31 abgedichtet, gesteckt wird. In dieser zweiten Röhre kann dann die Beimpfung des Trägers 5 mit der Untersuchungsprobe durch den praktischen Arzt erfolgen, der dann die beiden Röhren in dem üblichen Holzkästchen an die Untersuchungsanstalt einschickt. Die Stöpsel 33 und 34 übernehmen die Abdichtung der Röhre 31 und 32. Diese Einrichtung eignet sich auch besonders gut für die Aufbewahrung und den Versand von Mikrobenkulturen.

Als Versandeinrichtung kann gemäß Fig. 4 auch ein schalenförmiges, mit Nährflüssigkeit gefülltes Unterteil 35 dienen, über das der Träger 5 mittels eines Spreng- oder Preßringes 37 gespannt ist. Mit diesem Unterteil, welches in geeigneter Weise von außen mit Nährflüssigkeit gefüllt werden kann, ist der Ring 39 lösbar durch eine Schraubverbindung od. dgl. verbunden. Er übt auf den Preßring 37 den erforderlichen Druck aus. Auf dem Ring 39 sitzt der Deckel 38 und wird mit ihm durch einen abreißbaren Klebestreifen verbunden. Vor dem Abenden der Probe klebt der Arzt über den Deckel 38 und den Ring 39 einen zweiten Klebestreifen mit einem Aufdruck, z. B. „beimpft“.

Das verwendete Material muß bruch sicher, chemisch indifferent und sterilisierbar sein. Besonders eignen sich die bereits bekannten Preßstoffe aus Silikonen. Um empfindliche Keime wäh-

rend desandes am Leben zu erhalten, ist es zweckmäßig, den beimpften Träger bzw. die mit diesem versehenen Einrichtungen in z. B. auf chemischem Wege Wärme gebenden Umhüllungen zu versenden.

PATENTANSPRUCHE:

1. Verfahren zum Züchten von Kleinlebewesen auf einem über einem Nährboden anzuordnenden saugfähigen Träger, dadurch gekennzeichnet, daß der Träger (5) während des Wachstums der Objekte auf eine oder beide Seiten des Trägers wirkenden Medien von beweglicher, z. B. flüssiger oder gasförmiger Beschaffenheit ausgesetzt wird.

2. Ausführung des Verfahrens nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß die Medien von außen qualitativ und quantitativ regelbar sind.

3. Ausführung des Verfahrens nach Anspruch 1 und 2, dadurch gekennzeichnet, daß der Träger (5) von einem oder mehreren Medien zwangsläufig, beispielsweise durch Bepulsen, Druck, Vakuum usw., beeinflusst wird.

4. Einrichtung zum Ausführen des Verfahrens nach Anspruch 1 bis 3, dadurch gekennzeichnet, daß die Einrichtung aus einem Behälter (4, 6, 11 bzw. 17, 20 bzw. 30, 31 bzw. 35, 38) besteht, welcher durch den eingelegten Objektträger (5) in zwei unabhängig voneinander mit dem Medium oder den Medien zu beschickende Kammern abteilbar ist.

5. Einrichtung nach Anspruch 4, dadurch gekennzeichnet, daß der Behälter aus einem schalenförmigen Boden (4, 35) besteht, über welchen der Träger (5) mittels einer Klemmeinrichtung gespannt und welcher durch einen Deckel (10, 38) verschließbar ist.

6. Einrichtung nach Anspruch 4 und 5, dadurch gekennzeichnet, daß der Boden (4) oder das Oberteil (6, 11) des Behälters eine an die jeweilige Kammer Feuchtigkeit abgebende Einlage, z. B. einen auswechselbaren Filzring (9), enthält.

7. Einrichtung nach Anspruch 4 bis 6, dadurch gekennzeichnet, daß zwischen Boden (4) und Deckel (11) des Behälters ein mit ersterem zu verklebender Preßring (6) zum Spannen des Trägers (5) angeordnet ist, welcher gleichzeitig die Feuchtigkeit abgebende Einlage (9) enthalten kann.

8. Einrichtung nach Anspruch 4 bis 7, dadurch gekennzeichnet, daß die Behälterteile nach außen durch Klebestreifen luftdicht abgeschlossen sind.

9. Einrichtung nach Anspruch 4, dadurch gekennzeichnet, daß der Behälter (17) durch die Anordnung eines Außenmantels (20) oder deren mehrere als Drei- oder Mehrkammersystem ausgebildet und jede Kammer von außen getrennt beeinflussbar ist.

10. Einrichtung nach Anspruch 4 und 9, dadurch gekennzeichnet, daß die Kammer des Behälters aus ineinandergeschobenen Rohren (17, 20), zweckmäßig aus durchsichtigen Werkstoffen bestehend, deren Enden durch die Zu- und Abflüsse für das jeweilige Medium enthaltenden Stirnwände (22, 23) verschlossen sind.

11. Einrichtung nach Anspruch 4, 9 und 10, dadurch gekennzeichnet, daß der Behälter reihenweise hinter- oder nebeneinander angeordnete Träger zum gleichzeitigen Behandeln von gleichem oder unterschiedlichem Züchtgut enthält.

12. Einrichtung nach Anspruch 4 bis 11, dadurch gekennzeichnet, daß einzelne oder alle Kammern mit Einrichtungen zur Herstellung klimatologischer oder sonstiger Bedingungen auf elektrischem, chemischem, mechanischem oder sonstigem physikalischem Wege ausgerüstet sind.

13. Einrichtung nach Anspruch 4, dadurch gekennzeichnet, daß der Objektträger (5) als Verschuß über die Mündung eines Rohres (31) gespannt und dem in einem zweiten Rohr (30) befindlichen Medium ausgesetzt ist.

14. Einrichtung, insbesondere nach Anspruch 13, dadurch gekennzeichnet, daß der Behälter mit einer auf chemischem Wege Wärme entwickelnden Einrichtung versehen ist.

15. Verfahren zur Verhütung einer Schädigung des Züchtmaterials unter gleichzeitiger Vereinfachung des Untersuchungsverfahrens, dadurch gekennzeichnet, daß die Untersuchungsprobe von ihrem Gewinnungsort bis zur vollendeten Züchtung auf ein und demselben Träger verbleibt.

16. Ausführung des Verfahrens nach Anspruch 15, dadurch gekennzeichnet, daß die Untersuchungsprobe bis zum Beginn des Züchtungsverfahrens auf dem Träger angetrocknet bleibt.

Hierzu 1 Blatt Zeichnungen •

Fig. 1

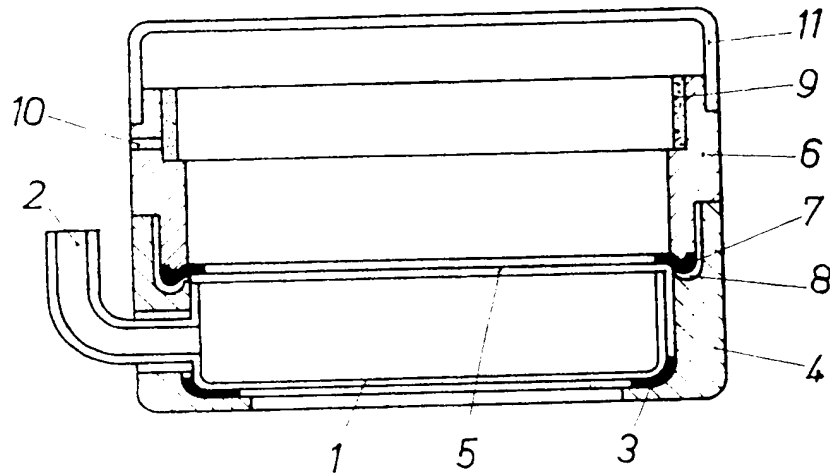


Fig. 2

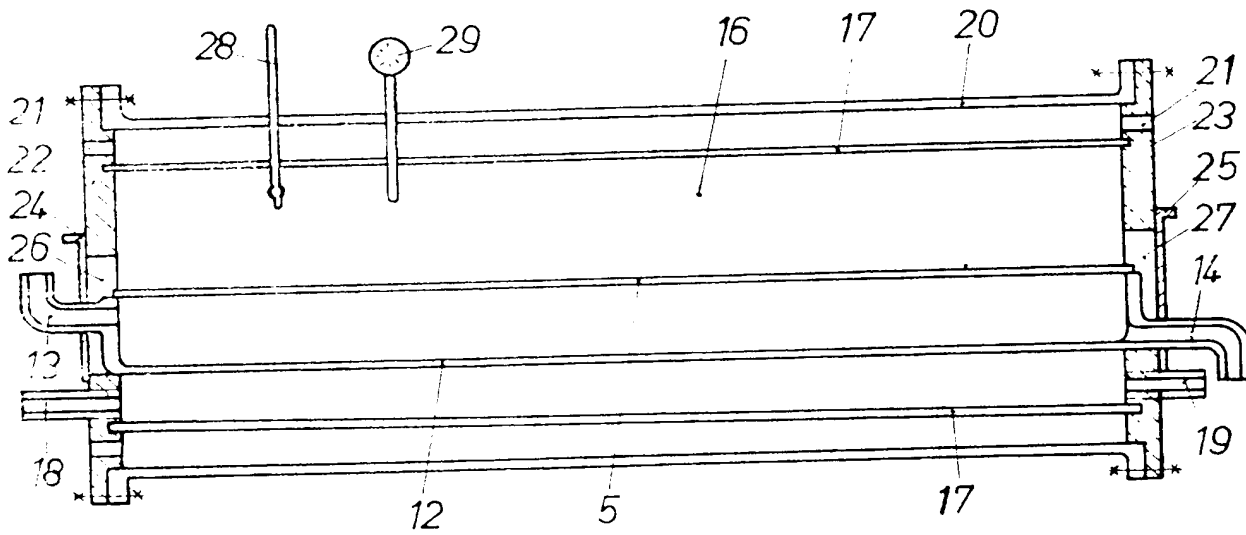


Fig. 3

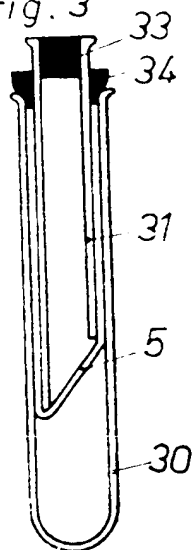


Fig. 4

